

OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE AND PREPARATION THEREOF

Patent Number: JP61033195
Publication date: 1986-02-17
Inventor(s): MIYOSHI KENICHI
Applicant(s): WAKUNAGA SEIYAKU KK
Requested Patent: ☐ JP61033195
Application Number: JP19840154578 19840725
Priority Number(s):
IPC Classification: C07H21/00
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

NEW MATERIAL:An oligonucleotide derivative expressed by formula I (m and n respectively represents 0 or a natural number; R<1> represents divalent hydrocarbon residue; B represents base constituting the nucleotide).
USE:An oligonucleotide used as a non-radioactive hybridization probe or for immobilization in genetic engineering, transformable to a natural type oligonucleotide, recoverable after use, and easily synthesized.
PREPARATION:Protecting groups R<2> and COR<4>, and protecting groups of both basic parts and phosphoric acid groups in a compound expressed by formula II (R<0> is a protecting group of phosphoric acid part; R<2> is a protecting group of amino group; COR<4> is a protecting group of 3'-terminal hydroxyl group in nucleotide; B' is a base constituting the nucleotide which may be protected if necessary) are eliminated by suitable methods.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-33195

⑬ Int.Cl.⁴
C 07 H 21/00
// C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号

6742-4C
7115-4B
8213-4B

⑭ 公開 昭和61年(1986)2月17日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全16頁)

⑮ 発明の名称 オリゴヌクレオチド誘導体およびその製造法

⑯ 特 願 昭59-154578

⑰ 出 願 昭59(1984)7月25日

⑱ 発 明 者 三 好 健 一 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

⑲ 出 願 人 湧永製薬株式会社 大阪市福島区福島3丁目1番39号

⑳ 代 理 人 弁理士 猪 股 清 外3名

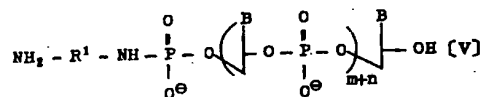
明 細 書

1. 発明の名称

オリゴヌクレオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式〔V〕で示されるものであることを特徴とする、オリゴヌクレオチド誘導体。



〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または自然数であり、R¹は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である(Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。〕

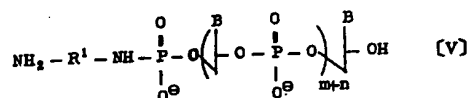
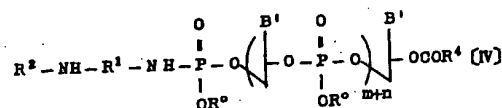
2. 塩基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

ド誘導体。

3. R¹が炭素数2～20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

4. mが0または6までの自然数、nが0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1～3項いずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

5. 下式〔IV〕で示される化合物の5'-末端延長上のアミノ基の保護基R²、3'-末端のCOR⁴基、塩基部分およびリン酸部分の保護基をすべて除去することを特徴とする、下式〔V〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。



〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または自然

であり、 R^0 はリン酸基の保護基であり、 R^1 は二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 R^2 はアミノ基の保護基であり、 OR^4 基はヌクレオチドの3'-末端水酸基の保護基であり、 B^1 はヌクレオチドを構成する塩基であって必要に応じて保護されたものであり、 B はヌクレオチドを構成する塩基である (B^1 または B および R^0 が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。)

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

技術分野

本発明は、一般に、天然型のオリゴヌクレオチドに変換可能な新規オリゴヌクレオチド誘導体に関する。さらに具体的に、本発明は、ヌクレオチドの5'-末端リン酸アミド基延長上に適度な長さのスペーサーを介して一級アミノ基を導入してなるオリゴヌクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなオリゴヌクレオチド誘導体

の製造法にも関する。

先行技術

近年、核酸の化学合成は新しい保護基の導入あるいはトリエステル法、ホスファイト法などの新しい縮合法の開発により飛躍的に進歩している。また、遺伝子工学の急速な進歩とあいまって、核酸の化学合成がこの分野でも重要な意義をもつようになってきた。例えば、人工遺伝子を合成し、遺伝子組換え操作を利用して有用物質の産生が行われている (インターフェロン: *Nature*, 281, 544 (1979)、白血球由来インターフェロン: *Nature*, 287, 411 (1980))。また、ハイブリッド法のためのプローブとしての例 (*Nucl. Acids Res.* 9, 879 (1981))、あるいは mRNA あるい是一本鎖 DNA から逆転写酵素あるいは DNA ポリメラーゼによって、二本鎖 DNA を合成する際に必要な鋳型 DNA に相補的な DNA 断片 (プライマー) として利用する例 (*Nucl. Acids Res.* 8, 4057 (1980))、などの応用例もある。

このうち、特に DNA プローブは、分子生物学の

分野で未知の遺伝子をつりあげたり、検出したりする道具としてばかりでなく、遺伝病の解析やウイルス感染、食物検査などに利用されてきており、その重要性はますます大きなものとなってきている。

ところで、非放射性核酸用アフィニティプローブは、放射性プローブに比べて、取扱い、被曝の危険性、価格、廃棄物処理、保存性などで有利であるところから、ここ2、3年その利用について関心が高まっており、既に利用方法も種々提案されている。例えば、ターミナルトランスフェラーゼを用いて2,4-ジニトロベンゼンを結合させたアデノシン三リン酸 (ATP) 誘導体を DNA の3'-末端に取り込ませ、2,4-ジニトロフェニル基を抗原として認識する抗ウサギ抗血清およびパーオキシダーゼを結合したヒツジ抗血清 (ウサギイムノグロブリン G 型を抗原として認識する) を用いて2,4-ジニトロフェニル基で標識された DNA を検出する方法 (*Nucl. Acids Res.*, 10, 6787-6796, (1982))、 T_4 RNA リガーゼを用い

ビオチンなどで標識したその基質誘導体を RNA の3'-末端に取り込ませることにより、目的とする RNA を検出する方法 (*Nucl. Acids Res.*, 11, 6167-6184 (1983))、トランスアミネーション反応によって RNA 鎖中のシトシンをエチレンジアミンで修飾して標識物質を導入することにより、目的とする RNA を検出する方法 (*Nucl. Acids Res.*, 12, 989-1002 (1984)) などがある。

しかしながらこれら上記で用いられている非放射性核酸用アフィニティプローブは、いずれも下記のような短所を有するものである。

イ、プローブの調製が複雑で煩わしい。

ロ、任意でかつ定められた塩基配列をもつプローブの合成が困難である。

ハ、塩基部分が修飾されているため、 T_m 値が変化する可能性がある。

そこで本発明者らはこれまでに前記化合物の短所を解消すべく新規なオリゴヌクレオチド誘導体について提案した (特開昭59-27900号公報、特願昭58-22516号、特願昭58-75878号各明細書、

特開昭59- 93098号、特開昭59- 93099号、特開昭59- 93100号各公報、特願昭59- 22474号、特願昭59- 22475号明細書)。

しかしながら、上記非放射性核酸用アフィニティプローブはもとより、本発明者らが先に開発したオリゴヌクレオチド誘導も、一旦標識物質あるいは担体と結合して使用した場合は、標識あるいは担体との結合前のオリゴヌクレオチド(すなわち天然型オリゴヌクレオチド)として回収することができないという点でその応用範囲が限定されているのが現状である。

発明の概要

要旨

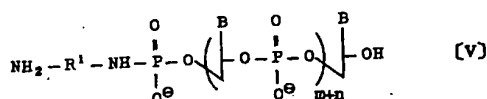
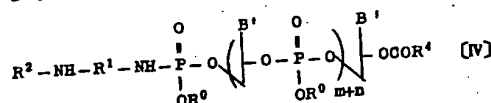
本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、天然型のオリゴヌクレオチドに変換可能なオリゴヌクレオチド誘導体の合成を試みるべく鋭意研究を重ねた結果、ホスホアルキルアミデートが塩酸中よりも酢酸中で速く水解されることおよびデブリネーションは酢酸中で遅いことを見出し、この事実をもとに天然型オリゴヌクレオチドに変

換可能なオリゴヌクレオチド誘導体およびその製造方法を開発することにより本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ヌクレオチドの5'-末端にリン酸アミド基を有してその延長上に適度な長さのスペーサーを介して一般アミノ基を導入してなるオリゴヌクレオチド誘導体によって上記の目的を達成しようというものである。

したがって本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、下式[V]で示されるものであること、を特徴とするものである。

また、本発明による下式[V]で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法は、下式[IV]で示される化合物の5'-末端延長上のアミノ基の保護基 R^2 、3'-末端の $OCOR^4$ 基、塩基部分およびリン酸部分の保護基をすべて除去すること、を特徴とするものである。



[ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^0 はリン酸基の保護基であり、 R^1 は二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 R^2 はアミノ基の保護基であり、 $OCOR^4$ 基はヌクレオチドの3'-末端水酸基の保護基であり、 B' はヌクレオチドを構成する塩基であって必要に応じて保護されたものであり、 B はヌクレオチドを構成する塩基である(B' または B および R^0 が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。]

効果

本発明による5'-アミノアルキル-オリゴデオキシリボヌクレオチドは、その構造中にリン酸アミド結合を有するので、弱い酸性条件下でこの部分で切断されて容易に天然型のオリゴヌクレオチドに変換することができる。

また、本発明によれば、下記のような効果も得

られる。

- (1) いかなる塩基配列を有するアフィニティークロマトグラフ用固定化オリゴヌクレオチドや非放射性ハイブリダイゼーションプローブをも製造することができる。
- (2) このオリゴチド誘導体は合成が非常に簡単であって、大量合成が可能である。
- (3) このオリゴヌクレオチド誘導体はその中に存在する他の官能基(水酸基、リン酸基および塩基部分のアミノ基など)よりも反応性が高い一般アミノ基を有するので、反応条件などの設定により他の化合物を選択的にアミノ基部分と結合させることが可能である。
- (4) このオリゴヌクレオチド誘導体は天然型のオリゴヌクレオチドに変換可能なので、上記したような固定化オリゴヌクレオチドや非放射性ハイブリダイゼーションプローブとしての応用範囲が広がる。すなわち、従来は固定化オリゴヌクレオチドはアフィニティカラムとして、また非放射性ハイブリダイゼーションプローブはプ

ローブとしての利用だけしか考えられなかったが、本発明の化合物のようにリン酸アミド結合を有するオリゴヌクレオチド誘導体を用いて上記プローブなどを造成していれば、該化合物は天然型オリゴヌクレオチドに変換可能であるところから、上記したように本来の目的（アフィニティカラム、プローブなどとして利用）に用いたのち、天然型のオリゴヌクレオチドとして回収し、さらに別の目的、例えばリンカーやプライマー（二本鎖 DNA を合成する際に必要な鋳型 DNA 断片）として利用したり、また遺伝子組換えにも利用することができる。なお、これらプライマーやリンカーとして使用する場合は、従来の合成プライマーやリンカーではリン酸化が必要であるところ、回収したオリゴヌクレオチドは天然型なので、リン酸化の必要がないという利点をも有する。

発明の具体的説明

オリゴヌクレオチド誘導体（化合物[V]）

定義


0～40、特に0～20、である。

基 R^1 は化合物[V]のヌクレオチド部分の5'-末端リン酸アミド基と一般アミノ基部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基である。これは、特に炭素数2～20程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましい R^1 は、炭素数2～6のアルキレン基である。

天然型オリゴヌクレオチドへの変換

本発明の化合物[V]の天然型オリゴヌクレオチドへの変換は、本化合物がリン酸アミド結合を有するので、通常のオリゴヌクレオチド合成の酸処理操作〔0.1 N 塩酸処理（Tetrahedron letters、22、1463-1466（1981））、80%酢酸処理（ジメトキシトリチル基の脱離条件）など〕によって容易に行うことができる。しかしながら、このような酸性条件下ではデオキシアデノシンが不安定〔アデノシンのグリコシド結合の切断（デブリネーション）が起こる〕なので、前記したような諸効果を制限なく（例えば、オリゴヌクレオチドの配列中にデオキシアデノシンが存在すれば、酸処理

本発明による天然型オリゴヌクレオチドへ変換可能なオリゴヌクレオチド誘導体は、前記の式[V]で示されるものである（以下、このオリゴヌクレオチド誘導体を化合物[V]という）。

式中、記号  は、2'-デオキシリボヌクレオシドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオシド残基を示すのに慣用されているものであって、具体的には下記のものである。



置換基 B はヌクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物[V]中に B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。

化合物[V]の重合度が $m+n$ で表示されているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれ m および n のフラクシオンを縮合させていることによるものである（詳細後記）。その場合の m は実用的には0～6、特に1～4、 n は実用的には

によってデブリネーションが起こり、完全な型でオリゴヌクレオチドが回収できない）うけるには、デブリネーションが起こりにくくかつリン酸アミド結合の水解が速やかに起こる条件が必要となる。本発明者らは種々の条件を検討した結果、80%酢酸処理が最も効率がよいことを見出した。

従って、本発明の化合物は80%酢酸処理によって効率的（デブリネーションが起こりにくく、リン酸アミド結合の水解が速い）に天然型オリゴヌクレオチドに変換することができるものであり、この条件で処理することにより前記の諸効果を確実に得ることができる。ここで、80%酢酸とは加水分解に使用すべき酢酸が80%濃度の水溶液であるということである。なお、本発明化合物[V]に対する選択的加水分解は、30～90%濃度の酢酸水溶液を使用した場合に一般に認められる。

化合物[V]の合成

一般的説明

化合物[V]、すなわち本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体、は合目的な任意の方法によっ

て合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式〔IV〕のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドの5'-末端リン酸アミド基に基 R^1 を介して保護された一級アミノ基を導入し、ヌクレオチドの塩基部分およびリン酸基部分が保護され、3'-末端に結合した水酸基の水素原子が OR^4 基で置換されたもの、のすべての保護基を除去することからなるものである。

一方、式〔IV〕の化合物（以下、化合物〔IV〕という）は、他の官能基部分が保護されたオリゴヌクレオチドの5'-末端リン酸アミド延長上での保護された一級アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ。

R^0 リン酸基を保護する置換基であって、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R^1 二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であ

る。

R^2 アミノ基の保護基であって、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

R^3 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であって、通常シアノエチル基が用いられる。

OR^4 通常のオリゴヌクレオチド合成法に用いられる3'-水酸基の保護基である。具体的には、 R^4 が低級アルキル基、アリール基（特に、フェニル基、またはメトキシ置換フェニル）、あるいは固相合成法の際に用いられる適当なスペーサーを持つ担体（ポリスチレン樹脂、ポリアミド樹脂）であるもの、がある。

R^5 5'-末端水酸基の保護基であって、通常メトキシトリチル基が用いられる。

m 0または任意の自然数。

n 0または任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 必要に応じて保護された塩基を示すが、通常

はN⁶-ベンゾイルアデニン、N-イソブチルグアニン、N⁶-ベンゾイルシトシンおよびチミン（すなわち保護不要）より選択される。

化合物〔IV〕の合成

式〔IV〕で示される化合物は、他の官能基部分が保護されたオリゴヌクレオチドの5'-水酸基とジアミノアルキレンの一方のアミノ基とをリン酸を介して結合させることができる、合目的な任意の方法によって合成することができる。

化合物〔IV〕の合成法をその一実施態様（第1図）について示せば、下記の通りである。第1図において、5'-水酸基化合物〔O〕にリン酸化剤（たとえば、ホスホジトリアゾリド、ホスホジクロリドまたはホスホベンゾトリアゾリドなど）を作用させてリン酸化し、ついでいずれか一方のアミノ基が保護されているジアミノアルキレン化合物〔I〕（この化合物はジアミノアルキレン〔NH₂-R¹-NH₂〕のいずれか一方のアミノ基を R^2 で保護することにより得ることができる）を縮合させることにより化合物〔II〕を得る。

なお、化合物〔O〕はオリゴヌクレオチドであって、通常のオリゴヌクレオチド合成法で製造可能である。合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。

一方、通常のオリゴヌクレオチド合成法、好ましくは本発明者らの固相合成法（Tetrahedron Letters 1979, 3635(1979)、Nucleic Acids Research 8, 5473(1980)、Nucleic Acids Research 8, 5491(1980)、Nucleic Acids Research 8, 5507(1980)、Nucleic Acids Research Symposium Series 7, 281(1980)）に従って合成した化合物〔III〕の5'-末端水酸基とした化合物〔III'〕と先に合成した化合物〔II〕とを縮合剤を用いて縮合させることにより化合物〔IV〕を得ることができる。縮合剤としては、メンチレンスルホニルテトラゾリドおよびメンチレンスルホニルニトロトリアゾリドが好ましい。なお、反応条件などの詳細は後記実験例を参照されたい。

化合物〔V〕の合成

化合物[V]は、上記化合物[IV]の保護基をすべて除去することによって得ることができる。

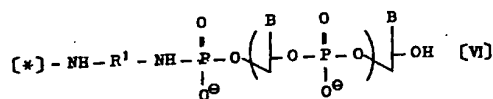
保護基 COR⁴基、リン酸トリエステル中のオルトクロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、0.5 M のテトラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水(9:1 (V/V)) 溶液で処理後、アルカリ処理(濃アンモニア水)を行うことにより除去される。R²がトリフルオロアセチル基の場合は、アンモニア処理により充分脱離されるが、オルトニトロフェニルスルフェニル基である場合はメルカプトエタノール処理が必要である。R²として他の保護基を用いた場合は、オリゴヌクレオチド部分が安定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴボヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であって、保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに縮合その他について上記以外の詳細は核酸の化学合成に関する成書や誌説たとえば「ヌクレオシド・ヌクレオチドの合成」(丸善 1977 年)、「核酸有機化学」(化学

同人 1979 年)、「核酸」(朝倉書店 1979 年)、Tetrahedron、34、31(1978)、有合成、34、723(1978)および化学の領域、33、566(1979)などを参照することができる。

本発明化合物[V]の応用

本発明の化合物は、5'-末端延長上に導入された一級アミノ基を介して標識物質や担体を結合することによって、非放射性アフィニティプローブや固定化オリゴヌクレオチドを造成することができる。なお、このような化合物は天然型オリゴヌクレオチドに変換することができ、前記したような諸効果を有することはいうまでもない。

このような化合物を一般式として示せば下記の通りである。



〔ただし、[*]は標識物質あるいは担体であり、それ以外の基の定義は化合物[V]についてのそれと同じである〕

化合物[V]の合成〔[*]が標識物質の場合〕

化合物[V]は、上記化合物[V]の5'-末端リン酸アミド基延長上の一級アミノ基に標識物質を結合させることができる合目的な任意の方法によって得ることができる。

標識物質としては、ビオチン、2,4-ジニトロベンゼン、蛍光物質(ローダミン、フルオロセインなど)、酵素(ワサビペーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼなど)および金属蛋白(フェリチンなど)などが考えられる。

その一実施態様としてビオチンを結合させる場合は、本発明者らが先に提案した特願昭58-22516号明細書記載の方法に従って行えばよい。すなわち、両者の結合はビオチンのカルボキシル基と化合物[V]のアミノ基との間の脱水によるアミド結合の形成を実現することのできる任意の方法によって行うことができる。化合物[V]中にビオチンのカルボキシル基との反応が可能なアミノ基または水酸基が存在するときは、それらを適当に保護

した状態でこの反応を行うことができる。一方、ビオチンもその機能的誘導体の形にあってもよい。ビオチンの機能的誘導体の具体例は、その酸ハライドまたはその活性エステルである。

このような意味でのアミノ基とビオチンとの結合を行わせる一つの好ましい方法は、アミノ基とビオチン活性エステルとの反応によることからなるものである。ビオチン活性エステルが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないで5'-リン酸アミド基末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。「ビオチン活性エステル」とは他の官能基(通常アミノ基)と反応しやすいエステル結合を持つビオチン誘導体を意味し、具体的にはスクシンイミド-、パラニトロフェニル、ベンゾトリアゾリド-、2,4,5-トリクロロフェニル-エステルなどがある。前二者が好ましい。

アミノ基とビオチンとの結合を行わせる他の好ましい方法の一つは、両者の結合を縮合剤の存在

下に行うことからなるものである。縮合剤として適当なものの例を挙げれば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルイミダゾール、ウッドワード試薬「K」などがある。ジシクロヘキシルカルボジイミドが好ましい。

いずれの方法による場合にも、反応方法は合目的な任意のものでありうる。所与の反応系に対する具体的な反応方法は、前記特許出願明細書、後記実験例および各種の成書、たとえば、「ペプチド合成」(丸善1976年)および「タンパク質の化学Ⅳ」(1977年)を参照して適当に定めればよい。

一方、結合させる物質が2, 4-ジニトロベンゼンの場合には、本発明者らが先に提案した特願昭58- 75878号明細書記載を参照すればよい。すなわち、両者の結合は、2, 4-ジニトロベンゼンの1-位と化合物[V]のアミノ基との間のO-N結合の形成を実現することのできる任意の方法によって行うことができる。

両者の結合は、一般に、前者の誘導体、すなわ

ちDNP-X (DNPは2, 4-ジニトロフェニル基、Xは1-置換基)とアミノ基との間の脱H-X縮合によることがふつうである。Xとしては、ハロゲンが好ましい。Xがハロゲンである誘導体、すなわち1-ハロゲン-2, 4-ジニトロベンゼンが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないで5'-リン酸アミド基末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。とりわけ、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンは市販されていて容易に入手でき、穏かな反応条件で化合物[V]のアミノ基との反応が進行する。

1-ハロゲン-2, 4-ジニトロベンゼンと化合物[V]との反応は、両者の均一溶液中(溶媒は、たとえば含水アルコール)あるいは不均一溶液中(溶媒は、たとえば水)、ハロゲン化水素捕捉剤(たとえば、炭酸水素ナトリウム、トリエチルアミン、水酸化カリウムなど)の存在下に、10~50℃程度の温度で実施することができる。目的生成

物は、たとえば抽出によって回収すればよい。なおDNP化に関しては、上記特許出願明細書以外に適当な総説、たとえば「実験化学講座Ⅰ、蛋白質の化学Ⅱ、第118頁」(1976年(丸善(株)発行)などを参照することができる。

化合物[V]の合成(※)が担体の場合)

結合させるものが担体の場合も、上記標識物質と同様に化合物[V]の5'-末端リン酸アミド基延長上の一級アミノ基に担体を結合させることによって目的物を得ることができる。担体としては、天然の不溶性担体として、アガロース、デキストラン、セルロース、ガラス粒が、合成ポリマーとしてポリアクリルアミド、などが考えられるが、上記化合物と結合反応させやすいように、そのもの自体でなくその誘導体が好ましい。アガロースの場合は、その誘導体としてセファロース誘導体(ファルマシア社)が数種市販されている。

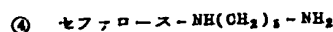
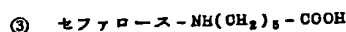
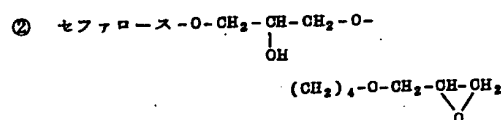
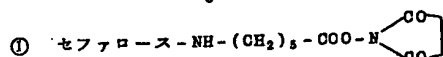
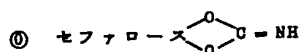
両者の結果は、たとえば担体がセファロース誘導体であればその誘導体中のカルボキシル基と化合物[V]のアミノ基との間の脱水によるアミド結

合を実現することのできる任意の方法によって行うことができる。化合物[V]中にセファロース誘導体のカルボキシル基との反応可能なアミノ基または水酸基が存在するときは、それらを適当に保護した状態でこの反応を行うことができる。一方、担体もその機能的誘導体の形にあってもよい。

担体がセファロースの場合は、セファロースの機能的誘導体の具体例としては、臭化シアン活性化セファロース(⑩)、活性化OHセファロース(⑪)およびエポキシ化セファロース(⑫)などがある。またセファロースのその他の誘導体としては、OH-セファロース(⑬)およびAH-セファロース(⑭)などがある(この場合は化合物[V]との反応に際して縮合剤(たとえばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC))が必要である)。結合させるべき化合物[V]の5'-末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、なおかつ縮合剤のいらないことから考えて、活性化OH-セファロースが最も好ましい(これらの詳細は下記参照)。

縮合反応は合目的な任意のものであり、所与

の反応系に対する具体的な反応方法は本発明者らが先に提案した特願昭59-27900号明細書、および成書や文献(アフィニティクロマトグラフィー、Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam (1978)、Agric. Biol. Chem., 37, 465(1973)、ibid、37, 1191(1973)、ibid、80, 409(1976)、蛋白質・核酸・酵素(別冊) No.22(1980))および後記実験例を参照されたい。



実 験 例
実 験 例 I

リン酸化)を行った。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認したのち、n-ブチルアミン(3 mmol、220 mg)および1-メチル-イミダゾール(3 mmol、240 mg)を加えて2時間反応を行った。反応液を濃縮後、クロロホルム(40 ml)に溶解し、ついでこれを水(40 mlで2回)、0.5 Mリン酸ナトリウム(40 mlで2回)、飽和炭酸水素ナトリウム(40 mlで2回)および5%塩化ナトリウム(40 mlで2回)洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥を行った。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルショートカラム(シリカゲス50 cm³、φ4 cm×5 cm、溶出液0-2%メタノール含有塩化メチル)で精製して、化合物(9)を油状物として得た(収量480 mg、回収率81%)。

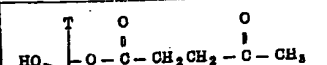
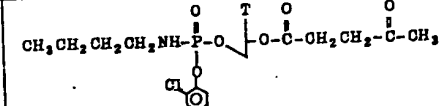
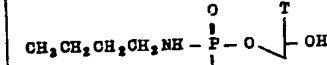
化合物(9)(構造は下記(約20 mg))にピリジン(0.5 ml)および濃アンモニア(2.5 ml)を加えて密栓し、50℃で一晩反応を行ったのち、これを濃縮し、50 mM トリエチルアンモニウムバイカーボネート緩衝液(pH 7.5)1 mlに溶解し、エーテル(1 ml)で3回洗浄を行い、水層を濃縮して、

酸性条件下でのホスホアルキルアミデートの水解性および同一条件下でのデオキシアデノシンの安定性を検討した。ホスホアルキルアミデートの水解性の検討には、3'-レブロイル-ヌクレオシド化合物〔J. Am. Chem. Soc., 97, 1614, (1975)〕にホスホアルキルアミデートを導入した化合物(10)を使用し、デオキシアデノシンの安定性の検討には、通常の方法でオリゴヌクレオチドを合成したのち脱保護した化合物(10)を使用した。また、酸性条件としては、0.01 N塩酸(pH2)〔オリゴヌクレオチド合成における脱保護条件〕、80%酢酸〔オリゴヌクレオチド合成におけるジメトキシトリテル基の脱離条件〕および0.1 N塩酸(pH1)の各溶液を使用した。

(1) 化合物(9)の合成

化合物(9)(3'-レブロイルヌクレオシド化合物、構造式下記)をピリジン共沸により無水にしたのち、化合物(10)(1.0 mmol、340 mg)にオルトクロロフェニルホスホロベンゾトリアゾリド溶液(1.5 mmol、9 ml)を加えて、1時間反応(

化合物(9)を得た。

化合物	構 造
(9)	
(10)	
(11)	

(2) 酸性条件下でのホスホアルキルアミデートの水解性の検討

上記で合成した化合物(9)を80%酢酸、0.1 N塩酸および0.01 N塩酸溶液に各々溶解したのち、各々の溶液中でのホスホアルキルアミデートの水解性を調べた。ホスホアルキルアミデートの水解性は、各酸溶液中での化合物(9)の経時変化をHPLCでの溶出パターン(80%酢酸中)は、第2図に示す通りである。同図中〔〕内の数値は、

80%酢酸中での経過時間(時間)を示す。化合物⑩の経時変化は残存量[%]を計算して行った。すなわち HPLC にかけたときの溶出パターン(クロマトグラム)における化合物⑩とその分解物との面積比から各時間における化合物⑩の残存量を求めた。さらに同化合物の半減期をも計算した。そのときの結果は、表1に示す通りであった。

表 1

経過時間 (時間)	残 存 量 [%]		
	80%酢酸中	0.1N塩酸中	0.01N塩酸中
1	56	73	—
2	34	53	—
4	10.5	29	78
24	—	—	21
半減期 (時間)	1.25	2.2	10.5

上記の結果より、酸溶液中でのリン酸アミド結合(ホスホアルキルアミデート)の分解速度は、80%酢酸中で最も速く、0.01N塩酸中で最も遅いということがわかる。

この結果より、デブリネーションは80%酢酸中で最も速く、0.1N塩酸中で最も速いということがわかった。

以上の実験結果から、ホスホアルキルアミデートは塩酸中よりも酢酸中で速く水解されると、および逆にデブリネーションは酢酸中で遅いということ、すなわち塩酸中ではデブリネーションを伴わずリン酸アミド結合を水解することが困難であるのに対して、酢酸中では5~6時間処理で殆どデブリネーションを伴うことなくリン酸アミド結合が水解される、ということがわかった。従って、所望オリゴヌクレオチドの塩基配列中にデオキシアデノシンが存在する場合は、天然型のオリゴヌクレオチドへの変換操作は80%酢酸処理がよいということになる。

実 験 例 II

(1) フローチャート

第3図のフローチャートに従って、本発明の化合物(同図の化合物⑩)を製造した。
第3図で、記号は次の意味を持つ。

(3) 酸性条件下でのオリゴヌクレオチド安定性(デオキシアデノシンのデブリネーション)の検討

上記(2)と同一酸性条件下で、下記⑩(通常の合成法でオリゴヌクレオチドを合成したのち脱保護を行うことにより得た)の化合物を用いてオリゴヌクレオチドの安定性について検討した。オリゴヌクレオチドの安定性は、上記(2)と同様に各酸溶液中での化合物⑩の経時変化を HPLC で分析することによって行った。化合物⑩の経時変化も化合物⑩と同様にクロマトグラムの結果から残存量[%]と半減期を計算することによって調べた。得られた結果は、表2に示す通りであった。

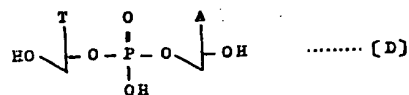
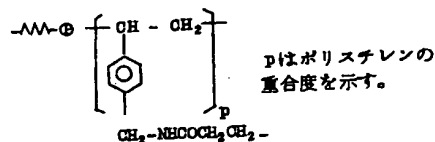


表 2

経過時間 (時間)	残 存 量 [%]		
	80%酢酸中	0.1N塩酸中	0.01N塩酸中
4	95	59	—
24	68	2.9	59
48	—	—	33
半減期 (時間)	44	5	30

B' チミジン
B チミジン
DMTr ジメトキシトリチル



R⁰ オルトクロロフェニル
Et エチル
OB -シアノエチル

[*] 標識物質または担体

m = 1

n = 6

(2) 化合物⑩(化合物[V])の製造

実験 1-1

ジメトキシトリチルチミジン/樹脂⑩(樹脂は担体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶことにする) 30 mg (3 μmol) を塩化メチ

レン(以下 CH_2Cl_2 と記す) 1 ml 中で5回洗浄後、3%トリクロロ酢酸含有塩化メチレン(以下3% TCA/ CH_2Cl_2 と記す) 1 ml で20秒ずつ6回反応(脱トリチル化)させて、樹脂(②)を得る。樹脂(②)を CH_2Cl_2 1 ml で5回洗浄し、さらに無水ピリジン 1 ml で5回洗浄後、樹脂の乾燥を行った。これにジヌクレオチド(③)(チミジンダイマー 25 mg 20 μmol)およびメチレンスルホニルニトリアゾリド(以下 MSNT と記す) 30 mg (100 μmol)と無水ピリジン 400 μl とを添加して50分間反応(縮合)させた。反応後、ピリジン 1 ml で5回洗浄し、触媒量(約 10 mg)のジメチルアミノピリジン(以下 DMAP)を含む無水酢酸-ピリジン(1:9、(v/v))溶液 1 ml を添加して5分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジン 1 ml で洗浄して、ヌクレオチド樹脂(④)($n=2$)を得た。以上のような操作を3回くり返して、ヌクレオチド樹脂(④)($n=6$)を得た。

一方、化合物(⑧)は、5'-ヒドロキシヌクレオ

チド(化合物(⑦)をリン酸化したもの)とモノトリフルオロアセチルジアミノアルキレン(化合物(⑥))とを反応させて合成した。

すなわち、まず化合物(⑥)の合成を以下の手順で行った。ヘキサメチレンジアミン(2.6 g、22.4 mmol)をジメチルホルムアミド(以下 DMF と記す) 50 ml に溶解したのち、氷冷下で攪拌しながら無水トリフルオロ酢酸(4.2 g、20 mmol)を滴下し、30分後に 1 N の塩酸(50 ml)を加え、減圧下で濃縮乾固を行った。残渣を 1 N の塩酸(50 ml)に溶解し、エーテル(50 ml)で3回洗浄(この操作でジトリフルオロアセチル体の除去)したのち、水層を濃縮乾固し、イソプロパノール(100 ml)抽出を行った。ここで得られたイソプロパノール層を濃縮乾固したのちアセトン 100 ml で抽出し、ついでアセトンを留去したのち、析出してきた結晶をエーテルで洗浄し、乾燥を行って、化合物(⑥)の塩酸塩を得た(1.8 g、収率 36%)。次に、5'-ヒドロキシチミジン化合物(⑦)(1 mmol、480 mg)(通常のヌクレオチド合成法で合成した

もの)をピリジン共沸により無水にしたのち、オルト-クロロフェニルホスホロジベンゾトリアゾリド溶液(1.4 mmol、8.4 ml)を加えて1時間反応を行った(リン酸化)。これに、無水にした上記化合物(⑥)の塩酸塩および 1-メチルイミダゾール(2.8 mmol、220 mg)を加えて、2時間反応を行った。反応終了後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5 M リン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および5%の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルカラムで精製(溶出液として0~4%のメタノール含有クロロホルムを使用)し、溶出液を濃縮後ペンタン中に滴下して、粉末状の化合物(⑧)を得た(330 mg、収率 38%)。

樹脂(④)($n=6$)を前述と同様の方法で脱トリチル化したもの(⑤)に、化合物(⑧) 30 mg (38 μmol)をトリエチルアミン-ピリジン-水(1:3:1、v/v)溶液 3 ml で処理(脱シアノエチル化)した

化合物(⑧)を加え、MSNT 30 mg (100 μmol)および無水ピリジン 400 μl を加えて、50分間反応(縮合)を行った。反応終了後、ピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴヌクレオチド誘導体(⑩)を得た。これを、0.5 M テトラメチルグアニジン-ピリジン-2-アルドキシムのピリジン-水(9:1 (v/v))溶液 300 μl で室温で一夜処理後、濃アンモニア水(2.5 ml)を加え、密栓した後、50℃で一夜放散(脱保護)した。ついで、樹脂を尹別し、水層を濃縮後、50 mM トリエチルアンモニウムバイカーボネート(以下 TEAB と記す)緩衝液(pH 7.5) 2 ml に溶解し、エーテルで抽出を行った。水層を濃縮後、セファデックス O-50(直径 1.5 × 長さ 120 cm、溶出液は 0.05 M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5)で脱塩精製して、オクタチミジル酸誘導体(⑪)を得た。

また、同様の方法で実験 1-2、1-3、および 1-4 のオリゴヌクレオチド誘導体を得た。実験例 1-1~1-4 の化合物の塩基配列を表 3 に

示す。

表 3

誘導体 実験例	化合物 ⑩ の 内 容		
	m+n	R ₁	(B) _{m+n} B
1-1	7	-C ₆ H ₁₂ -	TTTTTTTT
1-2	13	-C ₆ H ₁₂ -	TTTTTTTTTTTTTTT
1-3	13	-C ₆ H ₁₂ -	TAAAAAAAAAAAAAAAA
1-4	13	-C ₆ H ₁₂ -	TAATTTCATGTCTAT

ただし、上表中 A はアデニン、T はチミン、G はグアニン、C はシトシンを示す。

実験 1-2、1-3 および 1-4 についてセフアデックス G-50 カラムにかけたときの溶出パターンの結果は、第 4、6 および 8 図に、また、HPLC を行ったさいの溶出パターンの結果は各々第 5-(f)、7-(f) および 8-(f) 図に示す通りであった。これらの結果より、化合物 (V) が生成していることがわかる。なお、第 5、7 および 8 図中のピーク上の数値は保持時間 (分) を示すものである。

応 用 例

化合物 ⑩ を HPLC にかけたときの溶出パターンを示しており、(f) はいずれも化合物 ⑩ を HPLC にかけたときの溶出パターンを示すものであるが、いずれの図においても (f) および (f) は単一ピークであること、(f) より (f) のほうが保持時間が長くなっていることおよび特願昭 58-22516 号明細書中で明らかにされた事実 (一級アミノ基が選択的にビオチンと結合する) から、確かにビオチンオリゴヌクレオチド誘導体が生成していることがわかる。

実験 3-1 (天然型オリゴヌクレオチドへの変換)

上記で合成した化合物 ⑩ (実験 1-1) および化合物 ⑩ (実験 2-1) を、以下の手順に従って天然型オリゴヌクレオチドへ変換させた。なお、いずれの化合物の変換も操作は同一なので、化合物 ⑩ についてのそのみを記載するものとする。

化合物 ⑩ (約 1.0 OD) [化合物 ⑩ の場合は約 2.0 OD 用いた。] に 80 % 酢酸 100 μl を加えて、酸加水分解を行った。

化合物 ⑩ が天然型オリゴヌクレオチドへ変換

(i) ビオチンオリゴヌクレオチド誘導体の製造

実験 2-1

上記実験 1-1 で合成したオクタチミジル酸誘導体 ⑩ 約 1.0 OD を 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 8.3) 10 μl に溶解し、ビオチンスクシンイミドエステルのジメチルホルムアミド溶液 10 μl (数百倍過剰に相当) を加えて 4℃ で一夜反応を行って、ビオチン-オクタチミジル酸を合成した。

反応の確認は、HPLC および 20 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行った。

実験 2-2 ~ 2-4

上記実験 1-2、1-3 および 1-4 で合成した化合物 ⑩ についても実験 2-1 と同様な操作を行って、各々について化合物 ⑩ を製造した。

そのときに得られた化合物 ⑩ を HPLC にかけたときの結果は、第 5-(f)、7-(f) および 9-(f) 図に示す通りであった。同図中、ピーク上の数値は保持時間を示す。

第 5、7 および 9 図において、(f) はいずれも化

されるときの HPLC で分析した経時変化は、第 10 図に示す通りであった。図中、A は化合物 ⑩ のピークを示し、B は化合物 ⑩ が天然型オリゴヌクレオチドに変換されたときのピークを示す。また、[0] ~ [4] の [] 内の数値は、加水分解を始めてからの時間 (時間) を示す。第 10 図をみれば、時間が経つにつれてピーク A が減少し、それに伴ってピーク B が出現し、その後ピーク A は消失してピーク B のみになっていることがわかる。このことより、化合物 ⑩ は 4 時間の加水分解ではほぼ天然型オリゴヌクレオチドに変換していることがわかる。

また、化合物 ⑩ について化合物 ⑩ と同様に酸加水分解を行ったときの経時変化は、第 11 図に示す通りであった。図中の数値および記号は、化合物 ⑩ の場合と同じ意味をもつ。したがって、化合物 ⑩ も約 6 時間で天然型オリゴヌクレオチドに変換していることがわかる。

実験 3-2 ~ 3-4

実験 1-2 ~ 1-4 および実験 1-1-② ~ 1

- 1 - ④の化合物も、上記と同様に天然型オリゴヌクレオチドに変換した。

なお、以上の操作で得られた天然型のオリゴヌクレオチド〔⑨〕の構造は、下表にまとめた通りである。

	化合物	化合物〔⑨〕(天然型)
実験 3 - 1	①または②	PTTTTTTTOH
3 - 2	"	PTTTTTTTTTTTTTTOH
3 - 3	"	PAAAAAAAAAAAAAOH
3 - 4	"	PAATTTCATGTTTATOH

実験 4 - 1 (2 , 4 - ジニトロフェニルオリゴヌクレオチド誘導体の製造)

上記実験 1 - 1 で合成したオクタチミジル酸誘導体〔⑩〕約 1.0 OD を 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 8.3) 10 μ l に溶解し、1 - フルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンのエタノール溶液 (50 mg/ml) 5 μ l (大過剰) を加えて 37℃ で 2 時間反応させた後、水 30 μ l を加えエーテル 150 μ l で 4 回抽出を行って、2 , 4 - ジニトロフェニル - オク

タチミジル酸〔⑫〕を得た。反応の確認は、HPLC により行った。

上記実験 1 - 2、1 - 3 および 1 - 4 で合成した化合物〔⑪〕について実験 2 - 1 と同様な操作を行って、各々について化合物〔⑬〕を製造した。

実験 5 - 1

活性化 OH セファロース 4B (40 mg) を 1 mM - 塩酸で洗浄し、さらに 0.5 M 塩化ナトリウム - 0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) で洗浄後、化合物〔V〕(実験 1 - 1 : 4.0 OD 量) の 0.5 M 塩化ナトリウム - 0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) 200 μ l を加え、振盪しながら室温で一晩反応を行った。反応後尹過し、樹脂を 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) および 0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄して、樹脂〔⑬〕(ただし X - セファロース) を得た。

また、実験 3 - 1 と同様に酸加水分解を約 6 時間行うことにより、天然型のオリゴヌクレオチドを回収した。

4. 図明の簡単な説明

第 1 図は、本発明の化合物〔V〕および〔VI〕を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

第 2 図は、化合物〔⑩〕の 0.1 M 塩酸溶液中における経時変化を HPLC で分析したときのクロマトグラムを模写したものである。

第 3 図は、実験例 II で示した本化合物〔V〕および〔VI〕の合成のフローチャートである。

第 4、6 および 8 は、化合物〔V〕(それぞれ実験 1 - 2、1 - 3 および 1 - 4) をセファデックス G - 50 にかけたときのクロマトグラムを模写したものである。

第 5 - (I)、7 - (I) および 9 - (I) 図は、化合物〔V〕(それぞれ実験 1 - 2、1 - 3 および 1 - 4 の化合物) を HPLC にかけたときのクロマトグラムを模写したものである。

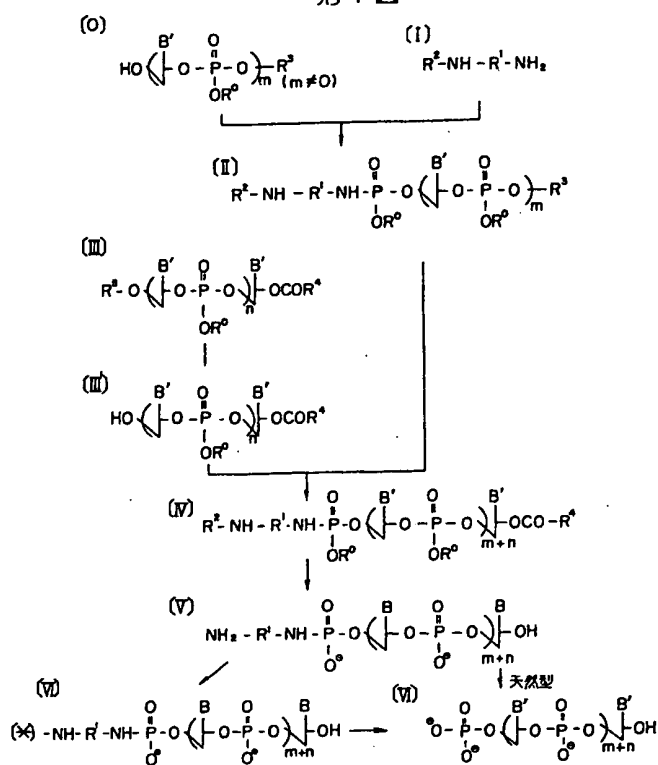
第 5 - (II)、7 - (II) および 9 - (II) 図は、化合物〔VI〕(それぞれ実験 2 - 2、2 - 3 および 2 - 4 の化合物) を HPLC にかけたときのクロマトグラムを模写したものである。

第 10 図は、化合物〔V〕(実験例 1 - 1) を酸処理 (80 % 酢酸) したときの化合物〔V〕の経時変化を HPLC で分析したときのクロマトグラムを模写したものである。

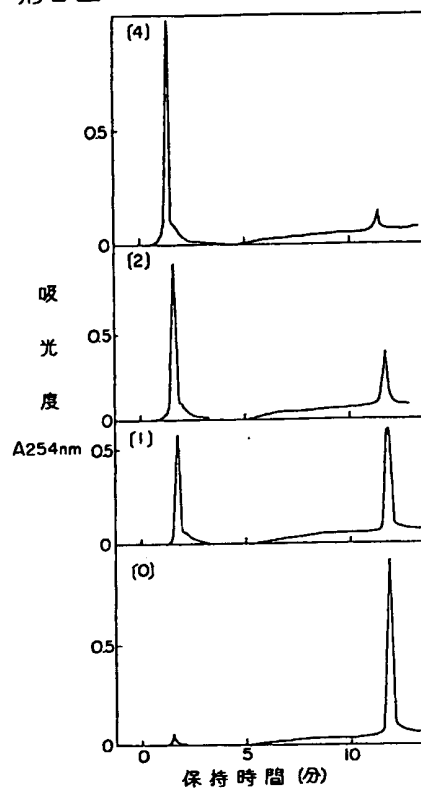
第 11 図は、化合物〔VI〕(実験例 2 - 1) を酸処理 (80 % 酢酸) したときの化合物〔VI〕の経時変化 HPLC で分析したときのクロマトグラムを模写したものである。

出願人代理人 猪 股 清

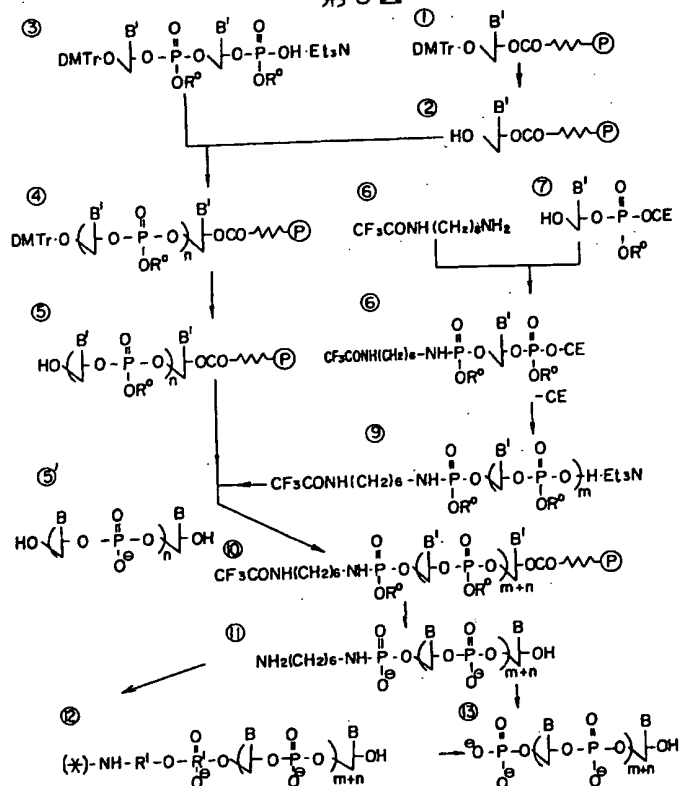
第1図



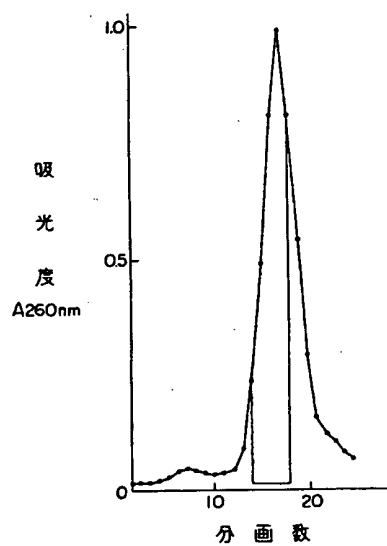
第2図

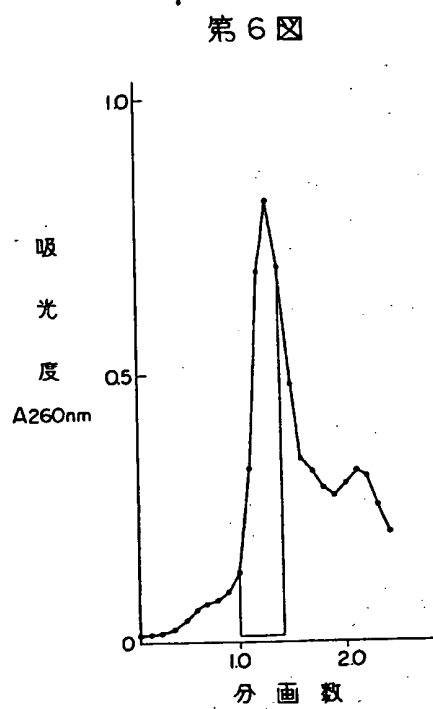
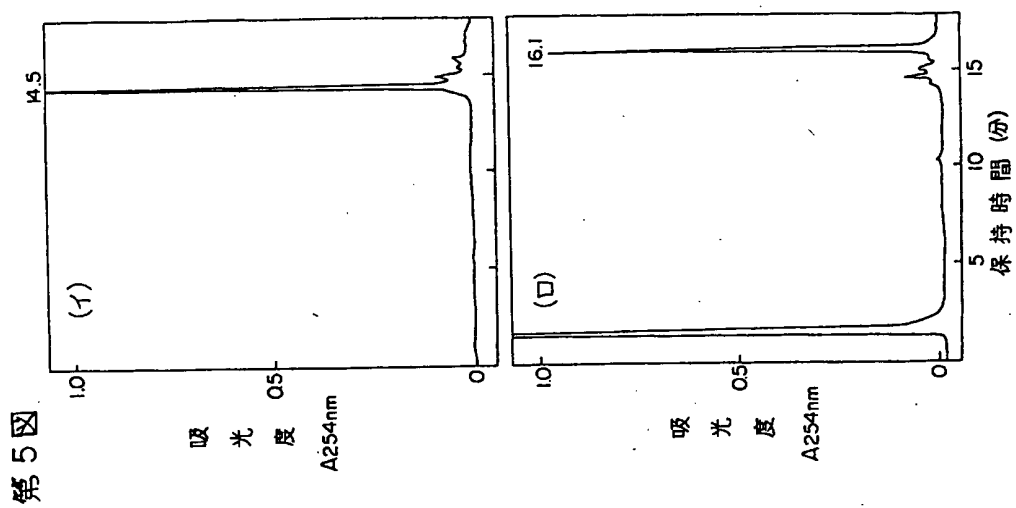


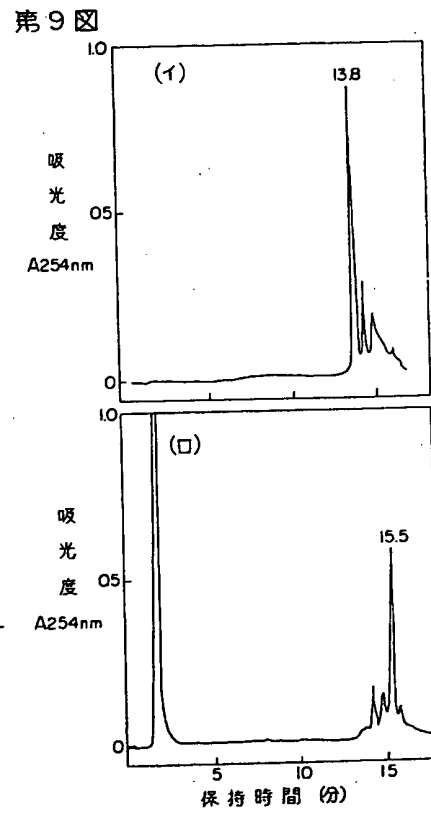
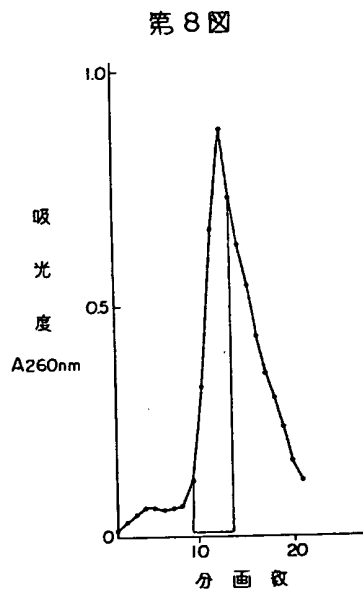
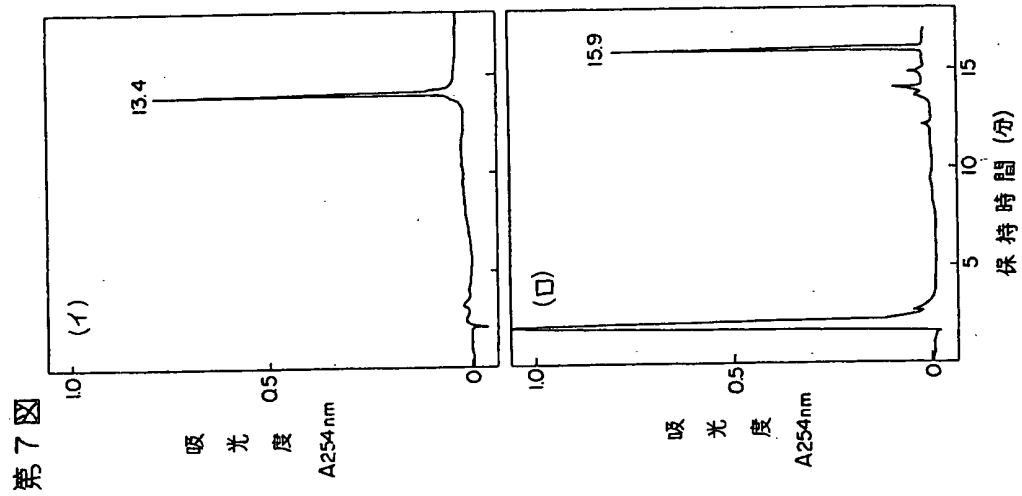
第3図



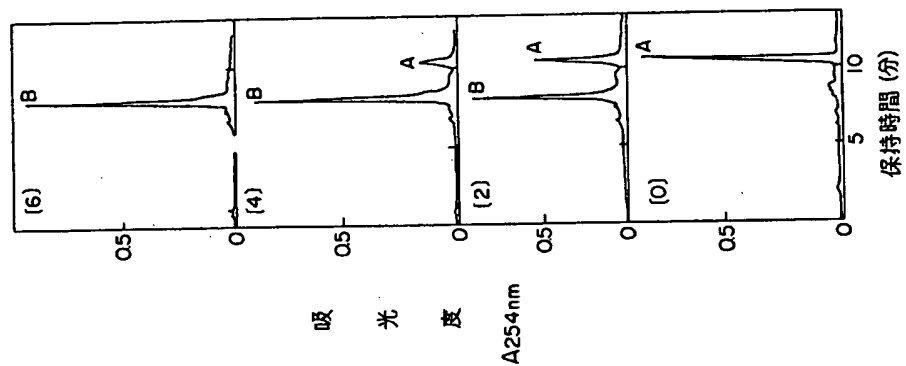
第4図







第11 図



第10 図

